



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 44 23 574 A 1**

⑤1 Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**C 07 K 14/00**  
A 61 K 38/48

⑳ Aktenzeichen: P 44 23 574.7  
㉔ Anmeldetag: 5. 7. 94  
㉓ Offenlegungstag: 11. 1. 96

DE 44 23 574 A 1

㉑ Anmelder:  
Boehringer Mannheim GmbH, 68305 Mannheim, DE

㉒ Erfinder:  
Kohnert, Ulrich, Dr., 82392 Habach, DE; Stern, Anne,  
Dr., 82377 Penzberg, DE; Martin, Ulrich, Dr., 68159  
Mannheim, DE; Fischer, Stephan, Dr., 82398 Polling,  
DE

⑤4 Nicht-glykosylierte Plasminogenaktivator-Derivate und ihre Verwendung bei erhöhtem Blutungsrisiko

⑤7 Ein nicht glykosyliertes Gewebsplasminogenaktivator-Derivat, welches die wesentlichen Teile mindestens einer Kringledomäne und eine B-Kette mit Serinproteasen-Aktivität des Gewebsplasminogenaktivators enthält und welches dadurch gekennzeichnet ist, daß die Aminosäuren 296-299 (Lys-His-Arg-Arg) jeweils gegen ein Alanin ausgetauscht sind, ist aufgrund des geringen Blutungsrisikos insbesondere zur Behandlung von subchronischen thromboembolischen Erkrankungen geeignet.

DE 44 23 574 A 1

BEST AVAILABLE COPY

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 11. 95 508 062/281

13/29

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft neue Plasminogenaktivator-Derivate, ihre Herstellung und Verwendung von Therapeutika zur Behandlung von thromboembolischen Erkrankungen bei erhöhtem Blutungsrisiko. Die Erfindung betrifft ebenso Verfahren zur Herstellung dieser Varianten und pharmazeutische Zusammensetzungen, welche diese Varianten enthalten.

Gewebsplasminogenaktivator (t-PA) ist eine aus mehreren Domänen bestehende Serinprotease, welche die Umwandlung von Plasminogen in Plasmin katalysiert und zur fibrinolytischen Therapie verwendet wird.

Es sind eine Vielzahl von t-PA-Varianten und Mutationen bekannt, vgl. beispielsweise die Übersichtsartikel T.J.R. Harris (1987) (1) und J. Krause (1988) (2).

Unter anderem ist bekannt, daß die Fibrinolyse teilweise durch die Interaktion zwischen t-PA und Plasminogenaktivator-Inhibitor 1 (PAI-1, ein Serinprotease-Inhibitor aus der Serpinfamilie) reguliert wird. Die Bindung von PAI-1 an t-PA erfolgt im wesentlichen über die Aminosäuren 296—302. Eine Mutation dieses Bereichs vermindert den inhibitorischen Einfluß von PAI-1 auf t-PA (E.L. Madison et al. (1990) (3)). Zum Mechanismus der Interaktion zwischen dem Aminosäurebereich 296—302 von t-PA mit PAI-1 wurden umfangreiche Untersuchungen durchgeführt (vgl. auch E.L. Madison, *Nature* 339 (1989) 721—723 (4), R.V. Schohet, *Thrombosis and Haemostasis* 71 (1994) 124—128 (5), C.J. Refino, *Thrombosis and Haemostasis* 70 (1993) 313—319 (6), N.F. Paoni, *Protein Engineering* 6 (1993) 529—534 (7) und *Thrombosis and Haemostasis* 70 (1993) 307—312 (8), W.F. Bennett, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 5191—5201 (9), D. Eastman, *Biochemistry* 31 (1992) 419—422 (10)).

t-PA-Varianten, bei deren Anwendung eine verminderte Blutungshäufigkeit auftritt, sind in der WO 93/24635 (11) und von B.A. Keyt et al., *P.N.A.S. USA* 91 (1994) 3670—3674 beschrieben. Diese t-PA-Varianten besitzen eine zusätzliche Glykosylierungsstelle an den Aminosäurepositionen 103—105. Zusätzlich können diese t-PA-Varianten eine Modifikation an den Aminosäuren 296—302 aufweisen, wodurch die Fibrinspezifität erhöht wird.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, weitere t-PA-Derivate zur Verfügung zu stellen, die bei der Anwendung verminderte Blutungskomplikationen zeigen.

Die Aufgabe der Erfindung wird gelöst durch ein nicht-glykosyliertes Gewebsplasminogenaktivator-Derivat, welches die wesentlichen Teile mindestens einer Kringledomäne und einer B-Kette von t-PA enthält, dadurch gekennzeichnet, daß die Aminosäuren 296—299 (Lys-His-Arg-Arg) jeweils gegen die Sequenz Ala-Ala-Ala-Ala ausgetauscht sind.

Derartige Plasminogenaktivatoren zeigen keine verbesserte Fibrinspezifität wie sie das analoge glykosylierte und an Position 296—299 modifizierte t-PA besitzt und sind zudem in vitro weniger aktiv als unmodifizierte Derivate oder Wildtyp-Plasminogenaktivator. Überraschenderweise zeigt sich jedoch bei der Anwendung der erfindungsgemäßen Plasminogenaktivator-Varianten ein deutlich vermindertes Blutungsrisiko und eine erhöhte in vivo-Aktivität, während die Aktivität in vitro deutlich reduziert ist.

Nicht modifizierter t-PA besteht in seiner im Plasma vorkommenden Form aus 527 Aminosäuren und kann durch Plasmin in zwei Ketten, die dann noch über eine Disulfidbrücke zusammengehalten werden, gespalten werden. Die A-Kette (auch schwere Kette genannt) besteht aus vier strukturellen Domänen. Die Fingerdomäne (Aminosäuren 1—49) zeigt gewisse Ähnlichkeiten mit den Fingerstrukturen in Fibronektin. Die Growth-Factor-Domäne (Aminosäuren 50—86) ist in gewissem Umfang homolog zu murinen und humanen epidermalen Wachstumsfaktoren. Die beiden Kringledomänen (Aminosäuren 87—175 und 176—262) sind im großen Umfang homolog zur vierten und fünften Kringledomäne von Plasminogen. Die Finger- und Kringle-2-Domänen von t-PA sind in der Fibrinbindung und in der Stimulation der proteolytischen Aktivität durch Fibrin besonders involviert. Die B-Kette von t-PA (Aminosäuren 276—527) ist eine Serinprotease und weitgehend homolog zu den B-Ketten von Urokinase und Plasmin (T.J.R. Harris (1987) (1) und J. Krause (1988) (2)). Unter den wesentlichen Teilen der Domänen sind die Aminosäurebereiche zu verstehen, welche für die biologische Wirksamkeit des Plasminogenaktivators erforderlich sind.

Vorzugsweise sind in den erfindungsgemäßen Plasminogenaktivator-Derivaten die Finger- und/oder die Growth-Factor-Domäne deletiert. In den erfindungsgemäßen Derivaten sind die Kringledomänen entweder beide erhalten, nur eine Domäne erhalten (vorzugsweise die K<sub>2</sub>-Domäne) oder es ist eine der Domänen (vorzugsweise K<sub>1</sub> oder K<sub>2</sub>) mehrfach (vorzugsweise verdoppelt) vorhanden.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen t-PA-Varianten kann nach den dem Fachmann geläufigen Methoden erfolgen. Vorzugsweise werden die erfindungsgemäßen Verbindungen gentechnologisch hergestellt. Ein derartiges Verfahren ist beispielsweise in der WO 90/09437 (25), EP-A 0 297 066 (26), EP-A 0 302 456 (27), EP-A 0 245 100 (28) und EP-A 0 400 545 (29), welche Gegenstand der Offenbarung für derartige Herstellverfahren sind, beschrieben. Danach werden die Mutationen an Position 296—299 durch "oligonucleotide-directed site-specific mutagenesis" in die cDNA von t-PA oder einem Derivat davon eingeführt. Die "site-specific mutagenesis" ist beispielsweise von Zoller und Smith (1984) (12), modifiziert nach T.A. Kunkel (1985) (13) und Morinaga et al. (1984) (19) beschrieben. Ebenso geeignet ist das Verfahren der PCR-Mutagenese, welches beispielsweise in Ausubel et al. (1991) (30) beschrieben ist.

Die Nukleinsäuresequenz des erfindungsgemäßen Proteins kann zusätzlich noch modifiziert sein. Derartige Modifikationen sind beispielsweise:

Veränderung der Nukleinsäuresequenz, um verschiedene Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen zur Erleichterung der Schritte der Ligation, Klonierung und Mutagenese einzuführen

Veränderung der Nukleinsäuresequenz zum Einbau von bevorzugten Codons für die Wirtszelle

Ergänzung der Nukleinsäuresequenz, um zusätzliche Regulations- und Transkriptionselemente, um die Expression in der Wirtszelle zu optimieren.

Die auf diese Weise erhaltene Nukleinsäure dient zur Expression des erfindungsgemäßen t-PA-Derivats,

wenn sie auf einem für die verwendete Wirtszelle geeigneten Expressionsvektor vorhanden ist.

Alle weiteren Verfahrensschritte zur Herstellung von geeigneten Expressionsvektoren und zur Expression sind Stand der Technik und dem Fachmann geläufig. Beschrieben sind derartige Methoden beispielsweise bei Sambrook et al. (1989) (14).

Die Herstellung der erfindungsgemäßen, nicht glykosylierten t-PA-Derivate erfolgt entweder in eukaryontischen Wirtszellen, wobei das dabei zunächst gewonnene glykosylierte Produkt durch dem Fachmann geläufige Methoden deglykosyliert werden muß, oder vorzugsweise durch Expression in nicht glykosylierenden Wirtszellen, besonders bevorzugt in prokaryontischen Wirtszellen.

Als prokaryontische Wirtsorganismen sind beispielsweise *E. coli*, *Streptomyces spec.* oder *Bacillus subtilis* geeignet. Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Proteine werden die Prokaryontenzellen in üblicher Weise fermentiert und nach Aufschluß der Bakterien das Protein in üblicher Weise isoliert. Falls das Protein in inaktiver Form (Inclusion Bodies) anfällt, wird es nach den dem Fachmann geläufigen Verfahren solubilisiert und naturiert. Ebenso ist es nach den dem Fachmann geläufigen Methoden möglich, das Protein als aktives Protein aus den Mikroorganismen zu sekretieren. Ein hierfür geeigneter Expressionsvektor enthält vorzugsweise eine Signalsequenz, die für die Sekretion von Proteinen in den verwendeten Wirtszellen geeignet ist, und die Nukleinsäuresequenz, welche für das Protein codiert. Das mit diesem Vektor exprimierte Protein wird dabei entweder in das Medium (bei gram-positiven Bakterien) oder in den periplasmatischen Raum (bei gram-negativen Bakterien) sekretiert. Zwischen der Signalsequenz und der für das erfindungsgemäße t-PA-Derivat codierenden Sequenz ist zweckmäßig eine Sequenz enthalten, die für eine Spaltstelle codiert, die entweder bei der Prozessierung oder durch Behandlung mit einer Protease die Abspaltung des Proteins erlaubt.

Die Auswahl des Basisvektors, in den die für das erfindungsgemäße t-PA-Derivat codierende DNA-Sequenz eingebracht wird, ist abhängig von den später zur Expression verwendeten Wirtszellen. Geeignete Plasmide sowie die Minimalanforderungen, die an ein derartiges Plasmid gestellt werden (z. B. Replikationsursprung, Restriktionsschnittstellen), sind dem Fachmann geläufig. Im Rahmen der Erfindung können auch anstelle eines Plasmids ein Cosmid, die replikative doppelsträngige Form von Phagen ( $\lambda$ , M13) oder andere dem Fachmann bekannte Vektoren verwendet werden.

Bei der Herstellung der erfindungsgemäßen t-PA-Derivate in Prokaryonten ohne Sekretion ist es bevorzugt, die sich bildenden Inclusion Bodies von den löslichen Zellpartikeln abzutrennen, die t-PA enthaltenden Inclusion Bodies durch Behandlung mit Denaturierungsmitteln unter reduzierenden Bedingungen zu solubilisieren, anschließend mit GSSG zu derivatisieren und das t-PA-Derivat durch Zugabe von GSH und von Denaturierungsmitteln in nicht denaturierender Konzentration oder von L-Arginin zu renaturieren. Derartige Verfahren zur Aktivierung von t-PA und Derivaten aus Inclusion Bodies sind beispielsweise in der EP-A 0 219 874 (15) und EP-A 0 241 022 (16) beschrieben. Es können jedoch auch andere Verfahren zur Gewinnung des aktiven Proteins aus den Inclusion Bodies verwendet werden.

Vorzugsweise erfolgt die Aufreinigung der erfindungsgemäßen t-PA-Derivate in Anwesenheit von L-Arginin, insbesondere bei einer Arginin-Konzentration von 10–1000 mmol/l.

Die Abtrennung von Fremdproteinen erfolgt vorzugsweise durch Affinitätschromatographie und besonders bevorzugt über eine Adsorbersäule, an der ETI (Erythrina trypsin Inhibitor) immobilisiert ist. Als Trägermaterial wird beispielsweise Sepharose® verwendet. Die Reinigung über eine ETI-Adsorbersäule hat den Vorteil, daß das ETI-Adsorbersäulenmaterial direkt aus dem konzentrierten Renaturierungsansatz sogar in Gegenwart von so hohen Arginkonzentrationen wie 0,8 mol/l Arginin beladen werden kann. Vorzugsweise erfolgt die Reinigung der erfindungsgemäßen Plasminogenaktivatoren über eine ETI-Adsorbersäule in Gegenwart von 0,6–0,8 mol/l Arginin. Die dabei verwendete Lösung hat vorzugsweise einen pH von über 7, besonders bevorzugt zwischen 7,5 und 8,6.

Die Elution der erfindungsgemäßen t-PA-Derivate von der ETI-Säule erfolgt durch pH-Erniedrigung sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Arginin unter Bedingungen, in denen die erfindungsgemäßen tPA-Derivate gut löslich sind. Vorzugsweise liegt dabei der pH-Wert im sauren Bereich, besonders bevorzugt zwischen pH 4,0 und 5,5.

Die erfindungsgemäßen t-PA-Varianten können zur Herstellung von Therapeutika in einer dem Fachmann geläufigen Weise formuliert werden, wobei die erfindungsgemäßen Verbindungen üblicherweise mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger kombiniert werden. Solche Zusammensetzungen enthalten typischerweise eine effektive Menge von 0,3–7 mg/kg, vorzugsweise 0,7–5 mg/kg und besonders bevorzugt 1–3 mg/kg Körpergewicht als Dosis. Die therapeutischen Zusammensetzungen liegen üblicherweise als sterile, wäßrige Lösungen oder sterile, lösliche Trockenformulierungen wie Lyophilisate vor. Die Zusammensetzungen enthalten üblicherweise eine geeignete Menge eines pharmazeutischen akzeptablen Salzes, mit der eine isotonische Lösung hergestellt wird. Weiter können Puffer wie Argininpuffer, Phosphatpuffer zur Stabilisierung eines geeigneten pH-Wertes (vorzugsweise 5,5–7,5) verwendet werden. Die Höhe der Dosierung der erfindungsgemäßen Verbindungen ist durch jeden Fachmann ohne weiteres zu ermitteln. Sie hängt beispielsweise ab von der Art der Anwendung (Infusion oder Bolus) und der Dauer der Therapie. Aufgrund ihrer verlängerten Halbwertszeit sind die erfindungsgemäßen Verbindungen besonders geeignet für eine Bolusanwendung (Einmalbolus, Mehrfachbolus). Eine geeignete Form für eine Bolusanwendung ist beispielsweise eine Ampulle, welche 25–1000 mg erfindungsgemäße Verbindung, Arginin und Puffer enthält. Die Anwendung erfolgt vorzugsweise intravenös, aber auch subkutan, intramuskulär oder intraarteriell.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen werden vorzugsweise als Mehrfachbolus angewendet. Geeignete Zeitintervalle sind zwischen 20 und 180 Minuten, besonders bevorzugt ist ein Intervall zwischen 30 und 90 Minuten und ganz besonders ist ein Intervall zwischen 30 und 60 Minuten bevorzugt.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen eignen sich insbesondere zur Behandlung von allen thromboembolischen Erkrankungen, wie z. B. akuter Herzinfarkt, Hirninfarkt, Lungenembolie, tiefe Beinvenenthrombose,

akuter arterieller Verschuß usw. Besonders bevorzugt werden die erfindungsgemäßen Verbindungen zur Behandlung von subchronischen thromboembolischen Erkrankungen, bei denen eine längere Thrombolyse durchgeführt werden muß, angewendet.

Es ist bevorzugt, die erfindungsgemäßen Verbindungen in Kombination mit einem Hemmstoff der Gerinnung (Antikoagulans), wie z. B. Heparin oder Hirudin und/oder einem Hemmstoff der Plättchenaggregation anzuwenden, wodurch die Gefäßöffnungswirkung bei geringen Nebenwirkungen gesteigert wird.

Die folgenden Beispiele und Abbildungen erläutern die Erfindung weiter.

Fig. 1 zeigt die Clot-Lyse-Aktivität von r-PA (Kurve I), r-PA (KHRR296—299AAAA) (Kurve II) und CHO-tPA (Kurve III) in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration.

Fig. 2 zeigt die Fibrinbindung von r-PA (Kurve I), r-PA (KHRR296—299AAAA) (Kurve II) und CHO-tPA (Kurve III) in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge an Fibrinogen.

Fig. 3 zeigt die Hemmung von CHO-tPA (Kurve I), r-PA (Kurve II) und r-PA (KHRR296—299AAAA) (Kurve III) in Abhängigkeit von der PAI-1-Konzentration.

#### Beispiel 1

#### Expression in E. coli

##### a) Konstruktion des Expressionsplasmids

Das Ausgangsplasmid pA27fd, beschrieben in EP-A 0 382 174 (17), wobei diese Veröffentlichung Gegenstand der Offenbarung ist, enthält die folgenden Komponenten: tac-Promoter, lac-Operator-Region mit einem ATG-Startcodon, die codierende Region für das t-PA-Derivat rPA, bestehend aus der Kringle2-Domäne (K2) und der Protease-Domäne (P), und den fd-Transkriptionsterminator; der Ausgangsvektor ist das Plasmid pKK223-3, welches in der EP-A 0 382 174 (17) beschrieben ist.

Zur Einführung der Mutation in die für das Derivat codierende Sequenz, nämlich der Austausch der Aminosäuren KHRR gegen AAAA in den Positionen 296—299 (Zählung der Aminosäuren gemäß Pennica et al. (1983) (18)) wird im wesentlichen die Methode von Morinaga et al. (1984) (19) durchgeführt. Das nach Mutagenese erhaltene Derivat wird im weiteren als rPA (KHRR296—299AAAA), abgekürzt rPA (KHRR), bezeichnet. Zur Heteroduplexbildung werden aus pA27fd zwei Fragmente isoliert. Fragment A: pA27fd wird mit dem Restriktionsenzym EcoRI gespalten. Die Spaltprodukte werden gelelektrophoretisch aufgetrennt und das größte EcoRI-Fragment aus dem Gel eluiert. Fragment B: Plasmid pA27fd wird mit dem Restriktionsenzym PvuI linearisiert und ebenfalls nach Gelelektrophorese präparativ erhalten. Für die Mutagenese wird das folgende Oligonukleotid synthetisch hergestellt:

5' CATCTTTGCCGCGGCAGCTGCATCGCCCGGAG 3' (SEQ 11) NO:1)

Zur Heteroduplex-Bildung werden Fragment A, Fragment B (je 450 fmol) und das Oligonukleotid (75 pmol) gemischt und in Gegenwart von 50 mmol/l NaCl, 10 mmol/l Tris-HCl pH 7,5 und 10 mmol/l MgSO<sub>4</sub> zunächst drei Minuten bei 100°C inkubiert und sofort auf Eis überführt. Die Renaturierung der DNA erfolgt für 30 Minuten bei 60°C. Zur Reparatursynthese wird dem Heteroduplex folgendes hinzugefügt:

Desoxynukleotidtriphosphat (0,25 mmol/l), ATP (1 mmol/l), NaCl (100 mmol/l), Tris-HCl pH 7,5 (6,5 mmol/l), MgCl<sub>2</sub> (8 mmol/l),  $\beta$ -Mercaptoethanol (1 mmol/l), Klenow-Fragment der DNA-Polymerase aus E. coli (0,125 U/ $\mu$ l Ansatz) und T4-Ligase (0,1 U/ $\mu$ l Ansatz). Die Reparatursynthese erfolgt für mindestens 4 Stunden bei 16°C. Anschließend wird dieser Ansatz zusammen mit dem Expressionshilfplasmid Plasmid pUBS520, beschrieben in Brinkmann et al. (1989) (20) und EP-A 0 373 365 (22) (wobei diese Veröffentlichungen Gegenstand der Offenbarung sind) in E. coli (z. B. C600<sup>+</sup>, vgl. EP-A 0 373 365 (22)) transformiert. Die Transformanten werden durch Zugabe von Ampicillin und Kanamycin (jeweils 50  $\mu$ g/ml) zum Nährmedium selektioniert. Das erhaltene Plasmid wird mit pA27Ala bezeichnet. Es unterscheidet sich vom Ausgangsplasmid durch den Austausch der Codons für die Aminosäuren KHRR durch AAAA und durch eine zusätzliche PvuII-Schnittstelle an der Mutagenesestelle.

##### b) Expression in E. coli

Zur Überprüfung der Expressionsleistung wird der mit den Plasmiden pA27Ala und pUBS520 transformierte E. coli-Stamm in LB-Medium (Sambrook et al. 1989, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor) (14) in Gegenwart von Ampicillin und Kanamycin (jeweils 50  $\mu$ g/ml) bis zu einer OD bei 550 nm von 0,4 angezüchtet. Die Expression wird durch Zugabe von 5 mmol/l IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-H-thiogalactosid) initiiert. Die Kultur wird für weitere 4 Stunden inkubiert. Im Anschluß daran werden die E. coli Zellen durch Zentrifugation gesammelt und in Puffer resuspendiert (50 mmol/l Tris-HCl pH 8, 50 mmol/l EDTA); durch Beschallung wird die Lyse der Zellen herbeigeführt. Durch erneute Zentrifugation werden die unlöslichen Proteinfractionen gesammelt und in oben genannten Puffer durch Beschallung resuspendiert. Die Suspension wird mit 1/4 Volumen Auftragspuffer (250 mmol/l Tris HCl pH 6,8, 10 mmol/l EDTA, 5% SDS, 5% Mercaptoethanol, 50% Glycerin und 0,005% Bromphenolblau) versetzt und mit Hilfe eines 12,5% SDS-Polyacrylamidgels analysiert. Als Kontrolle wird die gleiche Präparation mit einer Kultur von E. coli mit den beiden Plasmiden pA27Ala und pUBS520, die nicht mit IPTG versetzt worden ist, durchgeführt und im Polyacrylamidgel aufgetragen. In der Präparation der IPTG-induzierten Kultur kann man, nach Anfärben des Gels mit Coomassie Blue R250 (gelöst in 30% Methanol und 10% Essigsäure), eine deutliche Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 40 kD erkennen. Diese Bande ist in der Kontrollpräparation nicht vorhanden.

## c) Solubilisierung der unlöslichen Proteinfraction (Inclusion Bodies IB's)

100 g IB's (Naßgewicht) werden in 450 ml 0,1 mol/l Tris-HCl/6 mol/l Guanidin HCl/0,2 mol/l DTE (1,4-Dithioerythrit)/1 mmol/l EDTA pH 8,6 suspendiert und 2,5 h bei 25°C gerührt.

Nach Einstellen des pH-Werts auf pH 3 mit HCl (25%) wird eine Dialyse gegen 10 mmol/l HCl (3 × 50 l, 24 h, 4°C) durchgeführt.

## d) Derivatisierung

Guanidinhydrochlorid (fest) wird vorgelegt, so daß nach Endverdünnung des obengenannten Dialysats mit 10 mmol/l HCl die Konzentration von Guanidin-HCl 6 mol/l beträgt.

Der Ansatz wird bei 25°C 1,5 h vorinkubiert, anschließend oxidiertes Glutathion (GSSG) auf 0,1 mol/l Endkonzentration und Tris-HCl auf 0,05 mol/l Endkonzentration zugegeben und der pH-Wert mit 5 mol/l NaOH auf pH 9,3 titriert. Es wird bei 25°C 3,5 h gerührt.

Nach Einstellen des pH-Werts auf pH 3 mit HCl (25%) wird eine Dialyse gegen 10 mmol/l HCl (3 × 100 l, 48 h, 4°C) durchgeführt. Nach der Dialyse wird zentrifugiert und der klare Überstand weiterverarbeitet.

## e) Naturierung

Ein 10-l-Reaktionsgefäß wird mit 0,1 mol/l Tris-HCl, 0,8 mol/l L-Arginin, 2 mmol/l GSH (Glutathion, reduzierte Form), 1 mmol/l EDTA pH 8,5 gefüllt. Die Naturierung wird bei 20°C durch 3fache Zugabe von jeweils 100 ml Derivat (gemischtes Disulfid s. o.) im Zeitabstand von 24 h durchgeführt.

Der Renaturierungsansatz kann bei Bedarf über einen Hämodialysator konzentriert werden.

## Beispiel 2

Vergleich der plasminogenolytischen Aktivität von r-PA, r-PA (KHRR296—299AAAA) und CHO-t-PA

r-PA, r-PA (KHRR296—299AAAA) und CHO-t-PA (Actilyse®, rekombinanter glykosylierter t-PA mit der vollständigen Sequenz gemäß Pennica et al. (1983) (18), hergestellt aus CHO-Zelllinien) wurden mit 0,01 M Tris/HCl pH 7,5, 0,015% Tween 80® so verdünnt, daß im plasminogenolytischen Assay nach 2 h ein vergleichbarer Extinktionsanstieg erreicht wurde.

Die Bestimmung der plasminogenolytischen Aktivität erfolgte nach der in H. Lill (1987) (23) beschriebenen Methode, wobei der Inhalt dieser Publikation Gegenstand der Offenbarung ist.

Ergebnis: Während die "spezifische" plasminogenolytische Aktivität von r-PA um den Faktor 2 niedriger liegt als die von CHO-t-PA, ist die Aktivität von r-PA (KRR296—299AAAA) um den Faktor 30—36 gegenüber r-PA erniedrigt (vgl. Tabelle 1 bis 3).

Tabelle 1

Plasminogenolytische Aktivität von r-PA

	E <sub>405 nm/2h</sub>	C <sub>Prot</sub> (µg/ml)	E/C <sub>Prot</sub>
mit Stimul.	0.63	0.01	63
ohne Stimul.	0.56	0.31	1.81

Tabelle 2

Plasminogenolytische Aktivität von r-PA (KHRR296—299AAAA)

	E <sub>405 nm/2 h</sub>	C <sub>Prot</sub> (µg/ml)	E/C <sub>Prot</sub>
mit Stimul.	0.79	0.38	2.07
ohne Stimul.	0.14	3.00	0.05

Tabelle 3

Plasminogenolytische Aktivität von CHO-t-PA

	E <sub>405 nm</sub> /2 h	C <sub>Prot.</sub> (µg/ml)	E/C <sub>Prot.</sub>
mit Stimul.	0.08	0.006	133
ohne Stimul.	0.73	0.23	3.17

Beispiel 3

Vergleich der Clot-Lyse-Aktivität von r-PA, r-PA (KHRR296–299AAAA) und CHO-t-PA

r-PA, r-PA (KHRR296–299AAAA) und CHO-t-PA wurden mit Puffer auf die in der Tabelle und in den Abbildungen angegebenen Konzentrationen eingestellt und ihre Aktivität im Clot-Lyse-Assay bestimmt.

## Durchführung des Clot-Lyse-Assays

Die Probe wird durch Zugabe von Puffer (0,06 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4, 5 mg/ml BSA (Rinderserumalbumin), 0,01% Tween® auf die jeweils benötigte Proteinkonzentration eingestellt. 0,1 ml der Probe werden mit 1 ml Human Fibrinogen-Lösung (IMCO) (2 mg/ml 0,006 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4, 0,5 mg/ml BSA, 0,01% Tween 80® gemischt und 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend werden je 100 µl einer Plasminogen-Lösung (10 CU/ml 0,06 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4, 0,5 mg/ml BSA, 0,01% Tween 80®) und einer Thrombin-Lösung (30 U/ml 0,06 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4, 0,5 mg/ml BSA, 0,01% Tween 80) hinzugegeben und der Testansatz erneut bei 37°C inkubiert. Nach 2 min wird eine Teflon®-Kugel auf den Fibrin-Clot aufgelegt und die Zeit gestoppt, bis zu der die Kugel den Boden des Test-Röhrchens erreicht hat.

Ergebnis: Während die Clot-Lyse-Aktivität von r-PA um den Faktor 3–4 gegenüber der Aktivität von CHO-t-PA reduziert ist, ist die Aktivität von r-PA (KHRR296–299AAAA) gegenüber r-PA nochmals um den Faktor 100 erniedrigt (Tabelle 4, Fig. 1).

Tabelle 4

Protein	C <sub>Prot.</sub> (µg/ml)	Lyse-Zeit (min)
r-PA	0.5	12.3
	0.25	27.25
	0.125	49.35
	0.0675	79
r-PA (KHRR)	75	7.76
	37.5	14
	18.75	30.6
	9.38	50.6
CHO-t-PA	0.5	—
	0.25	8.75
	0.125	14.3
	0.0675	22.3

Beispiel 4

Vergleich der Fibrinbindung von CHO-t-PA, r-PA und r-PA (KHRR296–299AAAA)

CHO-t-PA, r-PA und r-PA (KHRR296–299AAAA) wurden gegen 0,5 M Arginin/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2 dialysiert und auf eine Proteinkonzentration von 0,15 mg/ml eingestellt. Alle Proben wurden mit 0,05 M Tris/HCl, pH 7,5, 0,15

M NaCl, 0,01% Tween 80® auf eine Proteinkonzentration von 1,5 µg/ml eingestellt. Jeweils 100 µl der Proben wurden mit 770 µl Testpuffer, 100 µl Fibrinogen (Endkonzentration wie in der Abbildung angegeben), 10 µl BSA (100 mg/ml H<sub>2</sub>O), 10 µl Thrombin (100 Units/ml), 10 µl Aprotinin (3,75 mg/ml H<sub>2</sub>O) gemischt und 1 h bei 37°C inkubiert. Der gebildete Clot wurde durch Zentrifugation (13.000 UPM, Sigma Zentrifuge) abgetrennt und die im Überstand vorhandene Enzym-Menge über ELISA bestimmt. Für jedes Protein wurde eine eigene Eichkurve erstellt.

Ergebnis: r-PA und r-PA (KHRR296—299AAAA) weisen eine identische Fibrinbindung auf, die sich deutlich von der Fibrinbindung von CHO-t-PA unterscheidet (Fig. 2).

#### Beispiel 5

##### Vergleich der Hemmung von r-PA, CHO-t-PA und r-PA (KHRR296—299AAAA) durch PAI-1

r-PA, Actilyse® und r-PA (KHRR296—299AAAA) wurden mit 0,01 M Tris/HCl, pH 7,5, 0,015% Tween 80® so verdünnt, daß sie im plasminogenolytischen Assay eine Extinktion von 0,7—0,9 (Wellenlänge 405 nm) nach 2 h erreichten. 40 µl der verdünnten Probe wurden mit 40 µl PAI-1 gemischt und 15 min bei 25°C inkubiert. 25 µl der Probe wurden in den plasminogenolytischen Test eingesetzt. Die Bestimmung erfolgte nach Lili et al. (1987) (23).

Ergebnis: r-PA und CHO-t-PA werden durch PAI-1 vergleichbar gehemmt. Eine vollständige Hemmung der beiden Enzyme wurde mit ca. 50 U/ml PAI-1 erreicht. Im Gegensatz dazu konnte r-PA (KHRR296—299AAAA) nur partiell gehemmt werden (Tabelle 5, Fig. 3).

Tabelle 5

PAI-1 U/ml	Relative Aktivität (%)		
	r-PA	r-PA (KHRR)	CHO-t-PA
0	100	100	100
5	96	90	91
10	72	76	—
30	33	51	17
40	12	43	5
50	8	37	4
60	6	36	3
80	4	35	2
100	2	30	2
150	2	28	1

#### Beispiel 6

##### In vivo Charakterisierung von rPA-(KHRR296—299AAAA)

Zur Prüfung der thrombolytischen Potenz und Effizienz wurde das von D. Collen (1983) (21) etablierte Kaninchenmodell der Halsvenenthrombolyse angewandt. Alteplase (rekomanter glykosylierter Gewebe-Plasminogenaktivator aus CHO-Zellen, kommerziell erhältlich als Actilyse® von der Firma Thomae, Biberach, Deutschland), r-PA (KHRR296—299AAAA), oder Lösungsmittel (0,2 M Argininphosphatpuffer) wurden den Kaninchen intravenös verabreicht: 10% der Gesamtdosis wurde anfänglich als i.v. Einmalbolusinjektion gegeben, der Rest über 4 h dauerinfundiert (6 ml/h). Im Anschluß an die Infusion wurde 4 h nach Beginn der Therapie der Restthrombus entfernt und das Ausmaß der Thrombusauflösung (Thrombolyse) mittels der Abnahme der Radioaktivität im Thrombus bestimmt.

Alteplase wurde in einer Dosis von 1 mg/kg untersucht, r-PA (KHRR296—299AAAA) wurde in Dosen von 0,3; 1 und 7 mg/kg verabreicht. Das Lösungsmittel wurde in einer Volumendosis von 26,7 ml appliziert. Zusätzliche Experimente wurden mit i.v. Bolus-Injektion von r-PA (KHRR296—299AAAA) durchgeführt (1 mg/kg; nach 2 h Messung der Thrombolyse). Plasmaprobe wurden vor, während und nach der Infusion bzw. Bolusinjektion wiederholt gewonnen. Die plasminogenolytische Aktivität wurde mit einem spektrophotometrischen Test nach Lill (1987) (23) gemessen. Die Halbwertszeit wurde mit graphischen Methoden der halblogarithmischen Plasmakonzentrationszeitkurve entnommen. Fibrinogen wurde nach Clauss bestimmt.

## Ergebnisse

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen:

Tabelle 6

Substanz	Dosis (mg/kg)	Infusion oder Bolus	Thrombolyse (%)	Rest-Fibrinogen (%)	Plasmakonzentration (U/ml)
Lösungsmittel	-	Infusion	17	104	6,2
Alteplase	1	Infusion	65	81	178,8
rPA (KHRR296-299AAAA)	0,3	Infusion	38	94	13,4
	1	Infusion	62	84	53,3
	7	Infusion	91	< 25	153
	1	Bolus	56	80	-

Mittelwert von 2-3 Experimenten pro Gruppe

Bei 1 mg/kg r-PA (KHRR296-299AAAA), gegeben als 4-h Infusion oder als i.v. Einmalbolusinjektion, wurde die gleiche thrombolytische Potenz und Effizienz wie bei 4-h Infusion der gleichen Dosis von 1 mg/kg Alteplase gefunden. Auch die Reduktion des Plasmafibrinogens war vergleichbar zwischen r-PA (KHRR296-299AAAA) und Alteplase. Überraschenderweise fand sich bei der 4-h Infusion von r-PA (KHRR296-299AAAA) nur ein Drittel der Plasmakonzentration von Alteplase, trotzdem wurde der gleiche thrombolytische Effekt gefunden. Eine weitere überraschende Beobachtung war, daß Tiere mit 1 mg/kg r-PA (KHRR296-299AAAA) nicht aus den Wunden am Hals bluteten, die bei der Präparation entstehen, während bei 1 mg/kg Alteplase diese Blutungen typischerweise auftraten.

r-PA (KHRR296-299AAAA) hatte nach i.v. Bolusinjektion von 1 mg/kg am Kaninchen eine dominante Halbwertszeit von 15 min (siehe Abb. 1a und 1b). Diese Halbwertszeit ist fünfmal länger als die Halbwertszeit (3 min) von Alteplase nach i.v. Bolusinjektion von 1 mg/kg (Martin et al., Thromb Res 1991; 62: 137-146) (24).

Zusammenfassend stellt sich r-PA (KHRR296-299AAAA) als ein thrombolytisch aktives Protein dar, das im Vergleich mit Alteplase eine 5-mal längere Halbwertszeit aufweist. Damit ist r-PA (KHRR296-299AAAA) für die Verabreichung als i.v. Bolus geeignet und erzielt die gleiche thrombolytische Wirkung wie die Standardinfusion von Alteplase bei der gleichen Dosis von 1 mg/kg. Überraschenderweise zeigten sich bei der Therapie mit r-PA (KHRR296-299AAAA) keine sonst üblichen Blutungen aus den Schnittwunden am Hals, obwohl sich die Fibrinspezifität von r-PA (KHRR296-299AAAA) nicht von der von Alteplase unterscheidet. Diese Eigenschaft hat große Bedeutung für die Verbesserung des Sicherheitsprofils neuer thrombolytisch aktiver Substanzen, da es die sonst bei Thrombolytika, wie z. B. Alteplase, übliche Blutungsnebenwirkung verringert oder sogar beseitigt.

## Referenzliste

- (1) T.J.R. Harris, Protein Engineering 1 (1987) 449-459
- (2) J. Krause, Fibrinolysis 2 (1988) 133-142
- (3) E.L. Madison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) 3530-3533
- (4) E.L. Madison, Nature 339 (1989) 721-723
- (5) R.V. Schohet, Thrombosis and Haemostasis 71 (1994) 124-128
- (6) C.J. Refino, Thrombosis and Haemostasis 70 (1993) 313-319
- (7) N.F. Paoni, Protein Engineering 6 (1993) 529-534
- (8) Thrombosis and Haemostasis 70 (1993) 307-312
- (9) W.F. Bennett, J. Biol. Chem. 266 (1991) 5191-5201
- (10) D. Eastman, Biochemistry 31 (1992) 419-422
- (11) WO 93/24635
- (12) Zoller und Smith, DNA 3 (1984) 479-488
- (13) T.A. Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 488-492
- (14) Sambrook et al., "Expression of cloned genes in E. coli" in Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA
- (15) EP-A 0 219 874
- (16) EP-A 0 241 022
- (17) EP-A 0 382 174
- (18) Pennica et al., Nature 301 (1983) 214-221

- (19) Morinaga et al., Biotechnology 21 (1984) 634  
 (20) Brinkmann et al., Gene 85 (1989) 109—114  
 (21) D. Collen, J. Clin. Invest. 71 (1983) 368—376  
 (22) EP-A 0 373 965  
 (23) H. Lill et al., ZGJMAL 42 (1987) 478—486  
 (24) Martin et al., Thromb Res 62 (1991) 137—146  
 (25) WO 90/09437  
 (26) EP-A 0 297 066  
 (27) EP-A 0 302 456  
 (28) EP-A 0 245 100  
 (29) EP-A 0 400 545  
 (30) Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, eds. Greene Publ. Assoc. and Wiley Interscience, Vol. 2, Chapter 15 (1991)

# Patentansprüche

1. Nicht glykosyliertes Gewebsplasminogenaktivator(t-PA)-Derivat, welches die wesentlichen Teile mindestens einer Kringledomäne und eine B-Kette von t-PA enthält, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Aminosäuren 296—299 (Lys-His-Arg-Arg) jeweils gegen ein Alanin ausgetauscht sind.
2. Gewebsplasminogenaktivator-Derivat nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Fingerdomäne und/oder die Epidermal Growth Factor-Domäne deletiert sind.
3. Gewebsplasminogenaktivator-Derivat nach den Ansprüchen 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Kringledomäne K1 oder K2 deletiert ist.
4. Gewebsplasminogenaktivator-Derivat nach den Ansprüchen 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Fingerdomäne, die Epidermal Growth Factor-Domäne und Kingle 1 deletiert sind und als aktive Domänen die K2- und die Proteasen-Domäne noch vorhanden sind.
5. Verfahren zur Herstellung eines Gewebsplasminogenaktivator-Derivats nach den Ansprüchen 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein Expressionsvektor, der eine Nukleinsäuresequenz, welche für den gewünschten Plasminogenaktivator codiert, enthält, in einer prokaryontischen Wirtszelle exprimiert, das entstandene Protein isoliert wird und, falls es in inaktiver Form entstanden ist, solubilisiert und aktiviert wird.
6. Verwendung eines nicht-glykosylierten Gewebsplasminogenaktivator-Derivats nach den Ansprüchen 1 bis 4 zur Herstellung eines Therapeutikums zur Behandlung von thromboembolischen Erkrankungen.
7. Verwendung gemäß Anspruch 6 zur Herstellung eines Therapeutikums zur Behandlung von tiefen Venenthrombosen, Myocardinfarkt oder Hirninfarkt.
8. Verwendung gemäß den Ansprüchen 6 und 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Therapeutikum eine effektive Menge des nicht-glykosylierten Gewebsplasminogenaktivator-Derivats von 0,1 bis 7 mg/kg Körpergewicht als Dosis enthält.
9. Verwendung nach den Ansprüchen 6 bis 8 zur Herstellung eines Therapeutikums, welches als Mehrfachbolus im Zeitintervall zwischen 20 und 180 Minuten angewendet wird.
10. Verwendung nach den Ansprüchen 6 bis 9 in Kombination mit einem Hemmstoff der Gerinnung (Antikoagulans) oder einem Hemmstoff der Plättchenaggregation.
11. Pharmazeutische Zusammensetzung eines nicht-glykosylierten Gewebsplasminogenaktivator-Derivats nach den Ansprüchen 1 bis 4, enthaltend ein pharmazeutisch akzeptables Salz in einer isotonischen Lösung.
12. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 11, welche einen pH-Wert von 5,5 bis 7,5 besitzt.
13. Pharmazeutische Zusammensetzung nach den Ansprüchen 11 und 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie einen Hemmstoff der Gerinnung (Antikoagulans) oder einen Hemmstoff der Plättchenaggregation enthält.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

Fig. 1 / 3

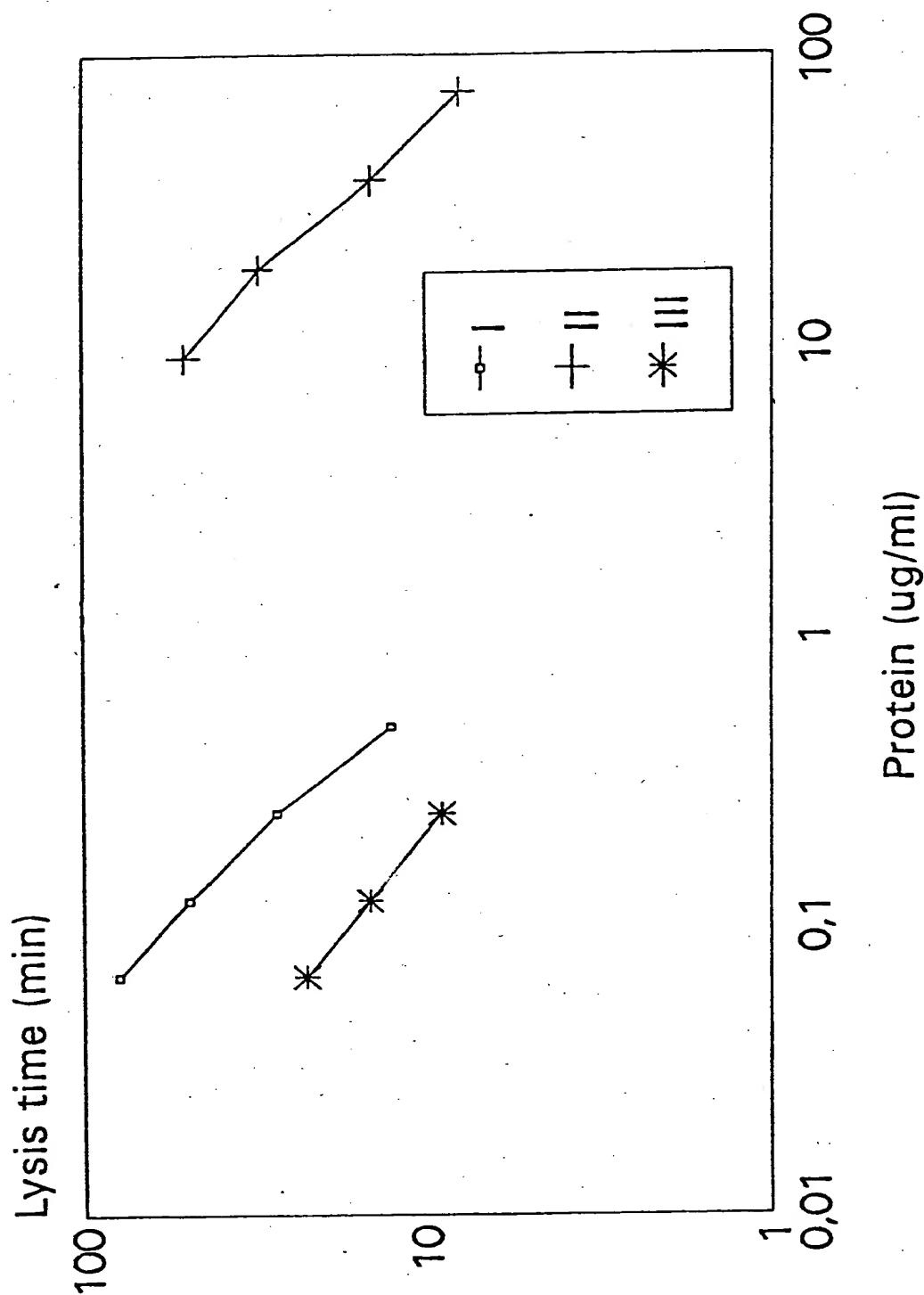
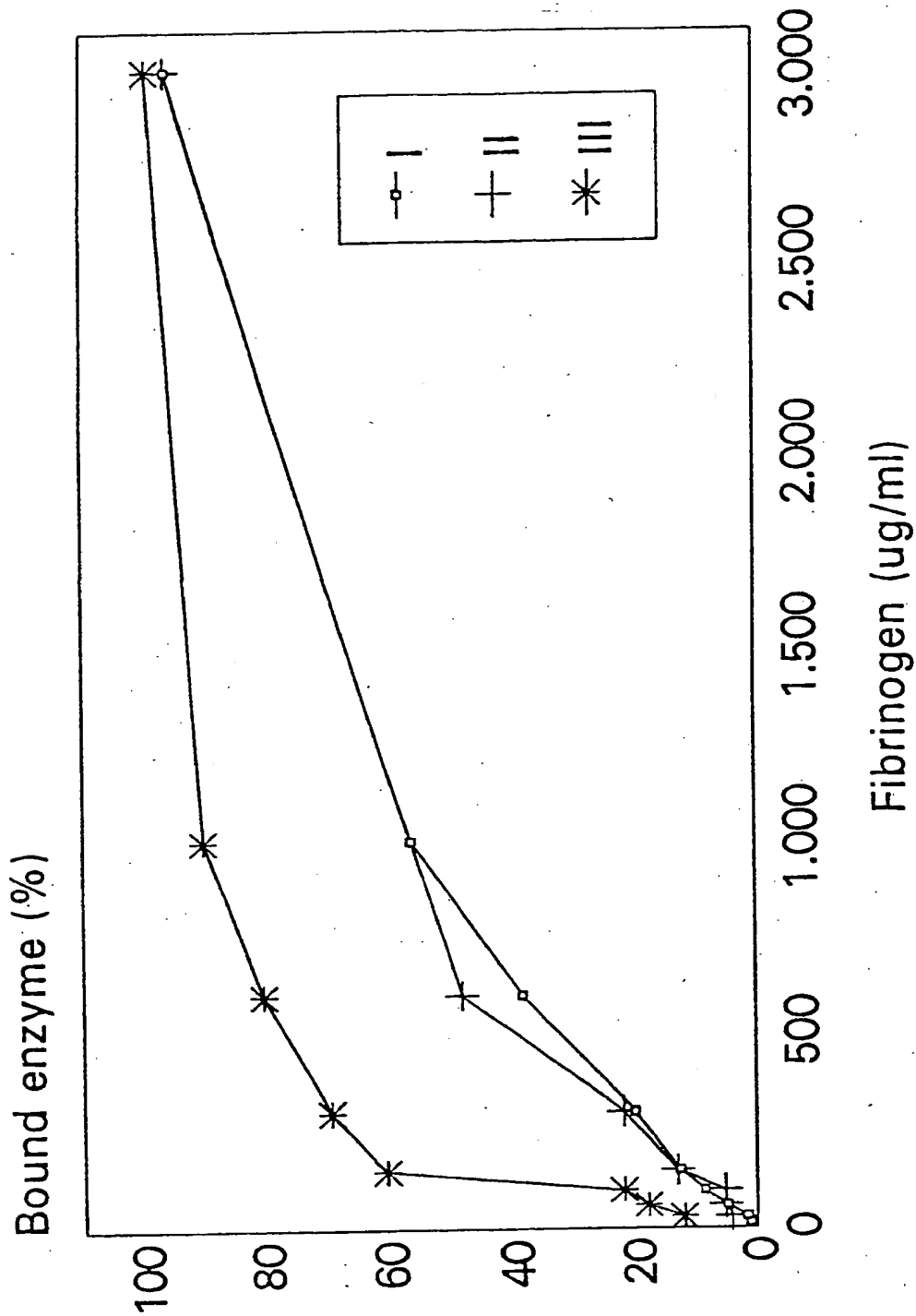
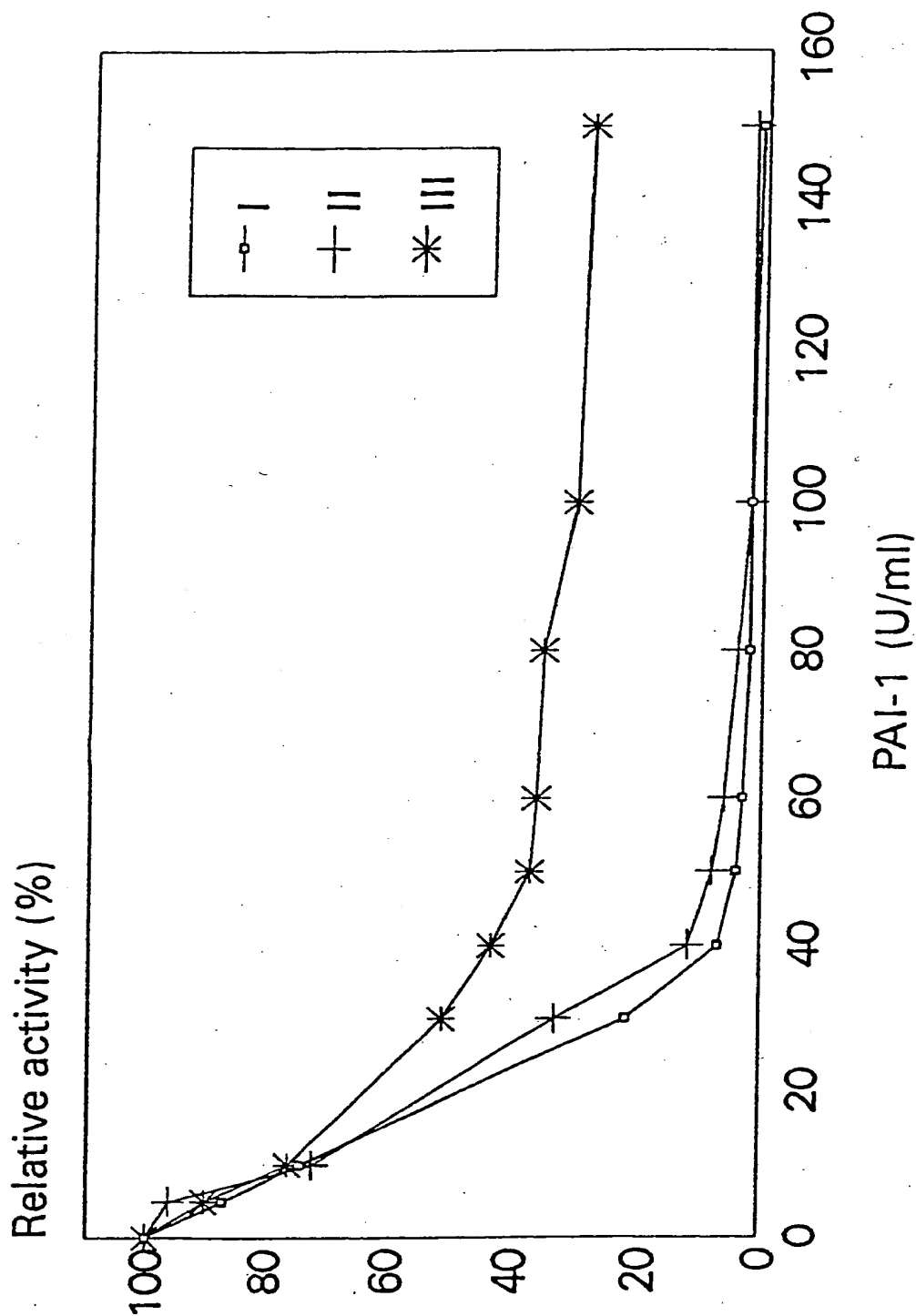


Fig. 2 / 3





**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

**This Page Blank (uspto)**